



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ

CURSO DE MEDICINA

VINÍCIUS DINIZ FERREIRA

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DO BIOCRISTAL DE 1,10-FENANTROLINA E
GLICINA COMPLEXADO COM COBRE (II)**

VINÍCIUS DINIZ FERREIRA

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO BIOCRISTAL DE 1,10-FENANTROLINA E GLICINA COMPLEXADO COM COBRE (II)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, Campus Imperatriz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis

IMPERATRIZ

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ferreira, Vinícius Diniz.

Atividade antitumoral do biocristal de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre II / Vinícius Diniz Ferreira. - 2022.

25 f.

Orientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz/MA, 2022.

1. Antineoplásico. 2. Câncer. 3. Compostos Organometálicos. I. Reis, Aramys Silva dos. II. Título.

VINÍCIUS DINIZ FERREIRA

ATIVIDADE ANTITUMORAL DO BIOCRISTAL DE 1,10-FENANTROLINA E GLICINA
COMPLEXADO COM COBRE (II)

Orientador: Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis
Universidade Federal do Maranhão – Curso de Medicina/CCIm

A Banca Julgadora de trabalho de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado ()

Reprovado ()

Banca examinadora:

Prof. Dr. Guilherme Graziany Camelo de Carvalho
Universidade Federal do Maranhão – Curso de Medicina/CCIm

Prof Esp Thamyres Cristhina Lima Costa
Centro Universitário Dom Bosco

Imperatriz-MA, 05 de Maio de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra Silvia Uliana do Instituto de Ciências Biomédicas da USP por ceder gentilmente as células RAW-264.7; a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS.....	7
4 DISCUSSÃO.....	13
5 CONCLUSÃO.....	19
6 AGRADECIMENTOS.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
ANEXOS.....	

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

Título: ATIVIDADE ANTITUMORAL DO BIOCRISTAL DE 1,10-FENANTROLINA E GLICINA COMPLEXADO COM COBRE (II).

Status: Não Submetido.

Revista: Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences.

ISSN: 1482-1826

Fator de Impacto: 2.327

DOI: N/A

RESUMO

Objetivo: O câncer é uma doença de múltiplos fenótipos, que demanda uma variedade de estratégias terapêuticas. Continuamente, substâncias com efeito antitumoral são avaliadas para o seu potencial uso clínico. Nesse contexto, complexos organometálicos a base de cobre (II) são alvos de diversos estudos. Dentre esses complexos, destacam-se aqueles que apresentam fenantrolina como ligantes orgânicos. Entretanto, o efeito antitumoral da combinação entre fenantrolina e aminoácidos em um mesmo complexo organometálico ainda não foi explorada. Assim, o presente trabalho procurou determinar se o biocristal de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II) (CuPhGli) apresenta atividade antitumoral. **Métodos:** Para isso, foram utilizados métodos *in vitro*, como o ensaio de MTT, para caracterizar a citotoxicidade frente a linhagens celulares, e *in silico*, como docagem molecular e predição de propriedades farmacocinéticas, para simular características de interação molecular com a molécula de DNA e possível comportamento farmacológico. **Resultados:** Foi evidenciado que o complexo apresentou atividade citotóxica *in vitro* para as linhagens celulares, além de demonstrar, *in silico*, interações hidrofóbicas com o sulco menor da molécula de DNA. Ademais, foi observado, por meio de predição *in silico*, um potencial perfil adequado de propriedades farmacocinéticas. **Conclusões:** Portanto, o complexo desse estudo apresentou atividade antitumoral *in vitro*, tendo na molécula de DNA seu potencial alvo molecular, além de demonstrar um perfil de interesse para futuras pesquisas farmacológicas. Entretanto, novas avaliações, em especial com ensaios *in vitro* e *in vivo*, devem ser realizadas para abranger as informações referentes a atividade citotóxica, seus alvos e o comportamento do complexo em sistemas biológicos reais.

ABSTRACT

Purpose: Cancer is a multiple presentation disease, that demands a variety of therapeutical strategies. Constantly, substances with antitumoral effect are assessed for their potential clinical use. In this context, copper (II) complexes are targeted by several studies. Among those complexes, the ones that present phenantroline as an organic ligand stands out. Nevertheless, the antitumoral effect of the combination between phenantroline and aminoacids in the same complex were still not explored. Hence, the present study aimed to determine the antitumoral activity of 1,10-phenantroline and glycine complexed with copper (II) (CuPhGli) biocrystal.

Methods: *In vitro* MTT assay and *in silico* molecular docking and pharmacokinetics properties prediction were performed to evaluate, respectively, the cytotoxicity against cell lines, the molecular interaction with DNA and a possible pharmacological behavior. **Results:** The complex exhibited cytotoxicity *in vitro* against all the cell lines and showed *in silico* hydrophobic interaction with the minor groove of the DNA molecule. Furthermore, the *in silico* properties prediction demonstrated an adequate pharmacokinetic profile. **Conclusions:** Therefore, the complex of this study presented antitumoral activity *in vitro*, with the DNA molecule as a potential molecular target. In addition, the complex had an adequate profile for future pharmacological research. However, more *in vitro* and *in vivo* studies are needed to expand the information on the cytotoxicity, its targets and the complex behavior on real biological systems.

1. INTRODUÇÃO

Visto como um problema de saúde pública, o câncer é considerado atualmente uma das quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) por doenças não transmissíveis em 179 países, sendo responsável por 4,5 milhões (29,8%) dessas mortes (1). Numerosas estratégias terapêuticas são constantemente desenvolvidas e aprimoradas para o controle dessa doença (2,3). No entanto, fármacos quimioterápicos atuais, apesar de efetivos, frequentemente estão sujeitos a resistência tumoral e apresentam efeitos adversos multissistêmicos importantes, como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros (4–6). Conseqüentemente, há uma demanda por novas drogas antitumorais que apresentem um perfil clínico mais seguro e maiores taxas de efetividade contra tumores resistentes.

Nesse contexto, complexos organometálicos são integrados na prática clínica pelo seu efeito antitumoral desde o advento da cisplatina e seus derivados, trazendo bons resultados em várias linhagens tumorais, apesar das taxas de resistência e efeitos adversos (7–9). Devido ao sucesso da cisplatina, atualmente novos compostos organometálicos são pesquisados com diferentes ligantes orgânicos e centros metálicos, especialmente cobre, rutênio, paládio e ouro (10). Em destaque, o cobre é um metal endógeno integrado a vários mecanismos fisiológicos, agindo como cofator de enzimas, controlando o processo de angiogênese, atuando na produção ou neutralização de espécies reativas de oxigênio, etc (11–13). Essa versatilidade fisiológica facilita sua inclusão nas diversas vias metabólicas celulares, especialmente em células tumorais (14), tornando-o um importante candidato ao desenvolvimento de novas drogas. Assim, vários complexos a base de cobre (II) demonstraram em estudos *in vitro* e *in vivo* possuírem importante atividade antineoplásica, induzindo morte celular para diversas linhagens tumorais (15–18). Um importante mecanismo de indução de morte celular observado para esses complexos é a lesão no material genético pela produção de espécies reativas de oxigênio pela molécula de cobre (II), tornando a molécula de DNA um alvo molecular frequente em estudos (19,20).

Além do centro metálico, os diferentes ligantes orgânicos influenciam diretamente o mecanismo de ação e efetividade do composto, alterando suas propriedades físico-químicas e promovendo maior ou menor interação com alvos moleculares específicos (21,22). A associação dos ligantes orgânicos fenantrolina ou aminoácidos em compostos de centros metálicos de cobre (II) já demonstrou um aperfeiçoamento da atividade citotóxica antitumoral pela presença desses ligantes (23–26). Entretanto, a combinação de 1,10-fenantrolina e um

aminoácido como ligantes orgânicos em um mesmo complexo de cobre (II) ainda não foi explorada, sendo apresentada aqui de forma inédita. Pressupõe-se que, além de facilitar a captação celular do complexo, a presença de ligantes nitrogenados facilitaria a interação do centro metálico com o DNA da célula tumoral, estabilizando a ligação com a molécula alvo.

Dessa forma, o presente estudo evidencia a atividade citotóxica antitumoral do biocristal de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II). Ademais, para elucidar um possível mecanismo para essa atividade, as interações do composto com a molécula de DNA foram abordadas por ensaio *in silico*. Por fim, predições dos aspectos farmacocinéticos referentes ao comportamento do biocristal também foram realizadas, a fim de avaliar o potencial uso clínico desse composto.

Novidade do trabalho

O presente trabalho avalia de forma inédita a atividade citotóxica da combinação de 1,10-fenantrolina associada a dois aminoácidos, glicina e serina, em complexos organometálicos a base de cobre (II). Foram realizados pela primeira vez avaliações *in vitro* com múltiplas linhagens celulares, além de simulações *in silico*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Síntese do complexo

O biocristal de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II) (CuPhGli), representado na figura 1, foi sintetizado e cultivado conforme Chu et al (27). Proporções equimolares de 1,10-fenantrolina 98% (Sigma-Aldrich) e cloreto de cobre (II) 99,6% (Sigma-Aldrich) foram homogeneizados em solução aquosa de metanol 80%, por agitação. O precipitado gerado foi filtrado e seco em estufa e posteriormente as massas moleculares foram estimadas por razões estequiométricas para o precipitado obtido, o aminoácido glicina e o bicarbonato de sódio. Os materiais foram diluídos em água deionizada em agitação magnética a uma temperatura de 40 °C. Ao final, a solução formada foi acondicionada em estufa à temperatura constante de 35 °C, para evaporação lenta.

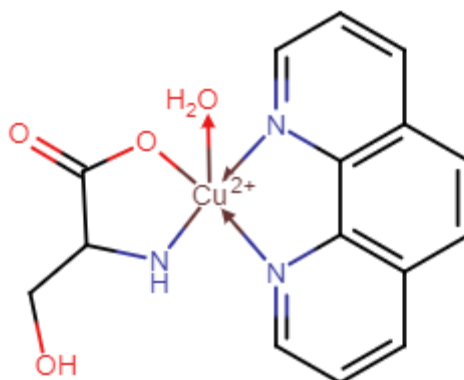


Figura 1. Estrutura molecular do biocristal de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II) (CuPhGli)

Linhagens celulares

Para avaliação da atividade antitumoral dos complexos de cobre (II) foram utilizadas as linhagens de células tumorais HL60 (células de leucemia mieloide), PC-3 (câncer de próstata) e SNB-19 (células derivadas de glioma humano). Para os ensaios, as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), L-glutamina 2mM e antibióticos (penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml) (Sigma-Aldrich) e mantidas a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade, por 72h. A linhagem de células RAW 264.7 (macrófago murinho) foi cultivada em meio DMEM (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e antibióticos (penicilina

100U/ml, estreptomicina 100µg/ml) (Sigma-Aldrich), sendo mantida em estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

Atividade citotóxica

Após cultivo das linhagens celulares, as células HL-60, PC-3 e SNB-19 foram incubadas em placa de 96 poços (3x10⁵ células/poço) com RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2mM, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Paralelamente, as células RAW-264.7 foram incubadas em placa de 96 poços (5x10⁴ células/poço) em meio DMEM, suplementado com 5% de soro fetal bovino, glutamina 2mM, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, todas as linhagens foram tratadas com o complexo CuPhGli em concentrações seriadas (12,50µM - 0,09µM) por 72hrs, a 37°C com 5% de CO₂.

Ensaio MTT

A atividade citotóxica foi caracterizada pelo ensaio de MTT, que consiste na análise colorimétrica da conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), solúvel em água e de coloração amarela, em cristais de formazan, insolúveis e de cor púrpura. A conversão do MTT ocorre apenas em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima mitocondrial Succinato Tetrazolium Redutase, fato que permite a quantificação das células vivas (28).

Após o período de incubação e exposição ao complexo, as placas foram centrifugadas, e o sobrenadante foi removido e substituído por meio (150µL) contendo MTT (0,5 mg/mL). Após três horas, as placas sofreram nova centrifugação, e o sobrenadante de formazan foi dissolvido em 150µL de DMSO. A absorbância foi então aferida por um leitor de placas (BioTek Elx800) a 540nm, permitindo o cálculo por regressão não linear da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀).

Índice de seletividade

O índice de seletividade (SI) foi determinado pela razão entre a IC50 para a RAW 264.7 e a IC50 para as linhagens tumorais. Como o SI demonstra a atividade diferencial de um composto puro, quanto maior o valor SI, maior sua seletividade.

Predição das propriedades farmacocinéticas (ADMET)

A metodologia *in silico* utilizada com o complexo desse estudo inclui ferramentas de análise de parâmetros físico-químicos, perfil farmacocinético e toxicidade. Para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos, como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), foram utilizados dois pacotes de software online disponíveis gratuitamente. O primeiro pacote, denominado pkCSM, trata-se de uma ferramenta baseada em modelamento gráfico, isto é, uma representação matemática de entidades químicas em gráficos, capaz de prever uma variedade de propriedades ADME (29). O segundo, denominado SwissADME, fornece acesso a modelos preditivos para propriedades físico-químicas, similarmente ao pkCSM, porém também permite o cálculo das similaridades entre diversas substâncias (SwissSimilarity), entre outras ferramentas paralelas (30).

Ademais, para os cálculos de previsão do perfil farmacocinético, os compostos foram desenhados e convertidos em formato SMILES. Dentre os diversos parâmetros avaliados, foi analisado a capacidade da substância em atravessar a barreira hematoencefálica, sua taxa de absorção (Caco2) e a taxa de absorção por células intestinais humanas. Quanto à absorção, esses ensaios permitiram prever a capacidade de inibição ou não inibição e formação de substrato pelas moléculas, por meio de seu comportamento nas subfamílias dos sistemas microssomais hepáticos CYP-450.

Docagem molecular

Um alvo molecular frequente para compostos organometálicos é a molécula de DNA (31,32). Para complexos organometálicos a base de cobre (II), a lesão no material genético e geração de espécies reativas de oxigênio é um importante mecanismo de atividade citotóxica a ser considerado (33). Assim, para caracterizar o comportamento do composto desse estudo em contato com moléculas de DNA, foi utilizado o docking molecular, ferramenta *in silico* cujo objetivo é prever a melhor orientação de um ligante ao seu alvo. Após determinar a orientação preferida, é possível prever a força de associação ou afinidade da ligação entre duas moléculas,

sendo um importante rastreador de possíveis alvos moleculares, além de trazer informações importantes na pesquisa por novas substâncias com potenciais terapêuticos (34).

Para obter a análise, inicialmente foi obtida a geometria das moléculas do complexo, por meio do programa Gaussian 09, seguido pelo software GaussView 5.0.8, que permite a obtenção do modelo estrutural 3D. A seguir, os cálculos de otimização geométrica foram realizados pelo método semiempírico, utilizando o Hamiltoniano PM6. Para o alvo da interação dos complexos, foi obtida a estrutura 3D da molécula de DNA, de alta resolução, previamente determinada por difração de raios-X e disponível a partir do Protein Data Bank (código PDB ID: 355D).

Após a determinação das estruturas geométricas, o alvo e seus ligantes foram preparados para simulação de docking com o software AutoDock Tools (versão 1.5.6) e os procedimentos de encaixe utilizaram o pacote Autodock 4.2. O receptor foi considerado rígido e cada ligante, flexível. As cargas parciais de Gasteiger foram calculadas após a adição de hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares da molécula alvo e do ligante foram posteriormente fundidos. Uma caixa cúbica (60x60x60 pontos com espaçamento de 0,35 Å entre os pontos da grade) foi gerada para o alvo da proteína inteira. Os centros de afinidade da grade foram definidos. O algoritmo genético Lamarckiano de busca global (LGA) (35) e os métodos de busca local (LS) Pseudo-Solis e Wets (36) foram aplicados para a realização do docking

Cada ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de encaixe, e outros padrões de encaixe foram definidos como valores padrão (37). Por fim, as conformações encaixadas resultantes foram agrupadas em famílias de acordo com o Root-Mean-Square Deviation (RMSD). Para uma análise mais detalhada, as coordenadas dos complexos selecionados foram escolhidas por inspeção visual associada a critério de menor conformação de ancoragem do cluster com menor energia.

3. RESULTADOS

Ensaio biológico

Os resultados indicam que a substância apresenta citotoxicidade para todas as linhagens. Os valores de IC₅₀ estão demonstrados na Tabela 1. Conforme observado, o composto possui menor IC₅₀, e conseqüente maior citotoxicidade, para a linhagem tumoral de câncer de próstata (PC-3) com valor de 2,6 µM, seguido pelos valores de IC-50 para a linhagem HL-60 (3,0 µM) e SNB-19 (4,0 µM).

Tabela 1. Valores de IC₅₀ e de S.I. (Índice de Seletividade) do complexo CuPhGli frente às linhagens tumorais HL-60, SNB-19 e PC-3 e a linhagem não tumoral RAW 264.7

Linhagem celular	Fenótipo	IC ₅₀ (µM)	S.I.
HL-60	Leucemia	3,0	1,3
PC-3	Câncer de próstata	2,6	1,5
SNB-19	Glioblastoma	4,0	1,0
RAW 264.7	Macrófago murino	4,1	-

Além da interação com linhagens tumorais, o valor de IC₅₀ para a linhagem não tumoral de macrófagos murinos (RAW 264.7) também foi aferido. O comparativo entre atividade citotóxica para linhagens tumorais e não tumorais é importante para determinar se a morte celular é induzida seletivamente a células patológicas ou se o composto também afeta células saudáveis. Para os macrófagos RAW 264.7, o complexo apresentou uma IC₅₀ maior, quando comparado às outras IC₅₀, com valor igual a 4,1 µM. Dessa forma, tem-se que os índices de seletividade (S.I.) para as linhagens PC-3, HL-60 e SNB-19 são, respectivamente, 1,5; 1,3; e 1,0.

Docking molecular

Como anteriormente proposto, o mecanismo de ação da citotoxicidade observada in vitro pode ser devido à interação da substância com o material genético celular, além de estímulo a vias

de oxidação e formação de espécies reativas de oxigênio. Para melhor elucidar as interações desse complexo com alvos moleculares específicos, foram utilizadas ferramentas *in silico*.

Uma vez demonstrada a citotoxicidade, os ensaios *in silico* auxiliam na identificação de possíveis alvos moleculares e a afinidade da ligação da substância com os mesmos. O docking molecular foi realizado com os ligantes do organometálico 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II), utilizando-se como alvo a molécula de DNA B sintética 355D, devido à hipótese de interação do complexo com o material genético. É importante ressaltar que foram considerados dois sítios principais de ligação na molécula alvo de DNA, correspondentes aos sulcos maior (sítio 1) e menor (sítio 2) da cadeia molecular. A estrutura geométrica do docking molecular está demonstrada na Figura 2.

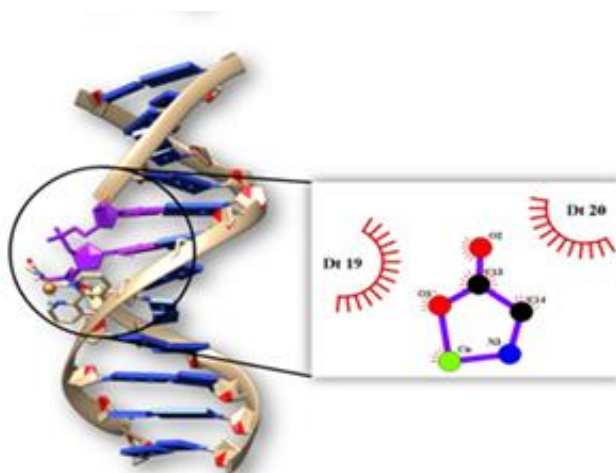


Figura 2. Docking molecular 3D do complexo CuPhGli com a molécula de DNA tipo B, sulco menor (alvo). Destaque para as interações hidrofóbicas entre o aminoácido e as bases nitrogenadas.

Dentre os diversos parâmetros analisados pelo docking, destacam-se os valores de Energia Livre de Ligação (ΔG_{lig}) e a Constante de Inibição (K_i), demonstrados na Tabela 2. Os valores de ΔG_{lig} refletem diretamente a afinidade das ligações entre o ligante e seu alvo, uma vez que demonstra a energia necessária para se estabelecer a interação. Dessa forma, quanto menores os valores de ΔG_{lig} , maior a facilidade com que a interação ocorre. O composto desse estudo apresentou valores negativos de energia de ligação ($-6,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$), o que corrobora com a espontaneidade das ligações.

Tabela 2. Parâmetros de afinidade Molecular do ligante CuPhGli com 355D em dois sítios

Complexo (Proteína-Ligante)	ΔG_{lig} (kcal.mol ⁻¹)	Ki (μ M)	Aminoácidos em Interação hidrofóbica
CuPhGli-355d 1	-6,6	14,0	Dc21
CuPhGli-355d 2	-6,6	12,9	Dt19 e Dt 20

Ademais, a análise *in silico* permitiu descrever que as ligações entre os aminoácidos da cadeia orgânica do complexo e as bases nitrogenadas Dt19 e Dt 20 ocorreram no segundo sítio ativo (sulco menor). O sulco menor é um alvo terapêutico particularmente interessante para pequenas moléculas, uma vez que a proximidade das fitas de DNA nessa região permite um contato mais íntimo e ligações mais estáveis entre o alvo e a substância (38). Entretanto, foi demonstrado que as ligações do complexo deste estudo com o sulco menor foram do tipo hidrofóbicas, que são interações mais fracas, conferindo menor estabilidade à ligação.

Propriedades Farmacocinéticas

Em pesquisas que avaliam substâncias candidatas a fármaco, é interessante complementar a análise com predições de propriedades farmacocinéticas (ADME) *in silico*, uma vez que apresentam simulações do comportamento desse composto. Avanços atuais nos métodos *in silico* são capazes inclusive de substituir parcialmente experimentos *in vivo*. Assim, para que se dispense o consumo de tempo e investimentos em substâncias inaptas para o desenvolvimento de fármacos, algumas propriedades podem ser avaliadas e preditas por simulações de modelos computacionais. Os parâmetros avaliados estão demonstrados na Tabela 3; os mais importantes foram destacados por cor: verde indica resultados “satisfatórios”, amarelo indica resultados “intermediários” e vermelho, resultados “insatisfatórios”.

Tabela 3. Predição das características farmacocinéticas e toxicológicas do complexo

ADMET	CuPhGli
Absorção	
LogS (log mol/l)	-3,20
P _{Caco-2} (log Papp em 10 ⁻⁶ cm/s)	96,10

HIA ¹ (%)	1,24
P _{skin} (cm/h)	-3,44
Glicoproteína P I (inibição)	Não
Glicoproteína P (substrato)	Não
Glicoproteína P II (inibição)	Não
Distribuição	
VD _{ss} ² (log L/kg)	0,11
Fração não ligada (F _u)	0,35
BHE ³ (log BB)	-0,01
SNC ⁴ (log PS)	-2,62
Metabolismo	
CYP2D6 substrato	Não
CYP3A4 substrato	Sim
CYP1A2 inibidor	Não
CYP2C19 inibidor	Não
CYP2C9 inibidor	Não
CYP2D6 inibidor	Não
CYP3A4 inibidor	Não
Toxicidade	
AMES Teste	Não
hERG I inibidor	Não
hERG II inibidor	Não
Hepatotoxicidade	Sim

¹HIA: Absorção Intestinal Humana

²VD_{ss}: Volume de Distribuição em Estado Estável

³BHE: Barreira Hemato-Encefálica

⁴SNC: Sistema Nervoso Central

Em relação aos parâmetros de absorção, foram avaliadas a solubilidade do composto em água, a permeabilidade da pele, absorção intestinal, permeabilidade de células Caco-2 e

interação com a glicoproteína P. Foi evidenciado, pelos baixos valores de LogS (-3,20), que o composto é insolúvel em água, uma vez que quanto menor o índice de absorção (LogS), menor a sua solubilidade nesse meio (39). Paralelamente, os valores baixos de P_{skin} (-3,44) também indicam que a pele é impermeável a substância (40). Para esses dois primeiros parâmetros, consideram-se valores indicativos de solubilidade em água e permeabilidade na pele, respectivamente, LogS > 0,010 e P_{skin} > -2,5 (40). De forma análoga, a absorção intestinal humana (HIA) também mostrou-se desfavorável, com valores de 1,242%, abaixo dos parâmetros ideais, que consideram absorção efetiva valores de HIA > 70% (41). Entretanto, foi observado que o biocristal apresenta boa absorção por células Caco-2 (linhagem de adenocarcinoma colorretal), com valor de P_{caco-2} igual a 96,10.

Por último, foi avaliada a interação do complexo com a glicoproteína-P, que possui papel importante na disponibilidade dos fármacos e está intrinsecamente relacionada com a resistência aos efeitos terapêuticos de substâncias (42). Ademais, essa glicoproteína foi associada com a presença de resistência adquirida por tumores a certos quimioterápicos (43). No presente estudo, foi demonstrado que não houve interação com essa glicoproteína.

Quanto aos parâmetros de distribuição, foram estimados: volume de distribuição em estado estável (VD_{ss}), fração não ligada, permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) e permeabilidade do sistema nervoso central (SNC). O VD_{ss} reflete a meia-vida e a posologia adequada para a substância avaliada (44). Idealmente, o valor de VD_{ss} deve estar acima de 0,45 log L/kg (40), porém para o biocristal CuPhGli, foi encontrado um valor de VD_{ss} igual a 0,11. A análise da fração não ligada evidenciou valor de 0,35 (35%) para a substância. Sabe-se que o efeito terapêutico é gerado pela fração livre, uma vez que a fração ligada a proteínas plasmáticas impede a entrada do complexo para o meio intracelular. Dessa forma, idealmente, a fração não ligada deve ser maior que 10% (40). Ademais, foi demonstrado que o composto apresenta coeficiente de permeabilidade da barreira hematoencefálica menor que 0,1 log BB, o que indica sua incapacidade de atravessar essa barreira (45). Paralelamente, os valores entre -2 e -3 para o log PS indica que o composto apresenta valores intermediários de permeabilidade para o sistema nervoso central (40).

Quanto aos parâmetros de metabolismo, foi avaliada a interação do composto com os complexos enzimáticos CYP. Essa análise é importante para prever possíveis interações medicamentosas com drogas metabolizadas por esse sistema, que é responsável por reações diversas, como desmetilação, hidroxilação e epoxidação, além de contribuir para o *clearance* hepático e intestinal (46). Foram avaliadas as interações com diversas isoformas dessa enzima,

dentre elas as principais responsáveis: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 (47,48). A interação inadequada com esse sistema enzimático poderia alterar o metabolismo e a excreção de numerosas substâncias terapêuticas e não terapêuticas. Para o presente composto, o estudo observou que a substância é substrato para o complexo microsomal hepático CYP3A4, porém sem promover sua inibição. Para as outras isoformas, não foram identificadas interações.

Por fim, o ensaio ainda permitiu prever alguns aspectos de toxicidade do complexo, como carcinogênese (teste de Ames), cardiotoxicidade (hERG I e II) e hepatotoxicidade. O teste de Ames caracteriza o potencial carcinogênico da substância (49) e demonstrou que o biocristal desse estudo não demonstra características mutagênicas. Ademais, o composto não inibiu os canais de potássio codificados pelo gene hERG I e II, cuja inibição é capaz de induzir prolongamento do intervalo QT. Entretanto, o composto demonstrou-se hepatotóxico.

4. DISCUSSÃO

O câncer é um conjunto de doenças de diversos fenótipos, que demandam, muitas vezes, várias estratégias terapêuticas específicas e individualizadas. Continuamente, novas drogas quimioterápicas são desenvolvidas, com abordagens antitumorais diferentes, índices de resistências e de efeitos colaterais menores, mecanismos de ação mais eficazes, entre outros aspectos (3,50). Nesse contexto, vários complexos organometálicos demonstraram ser uma importante fonte de substâncias com atividade antitumoral e potencial uso clínico, o que promove a existência de um campo de pesquisa crescente a procura de novos compostos baseados em metais (50).

O organometálico de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II) (CuPhGli) apresentou atividade citotóxica antitumoral *in vitro*, com valores de IC₅₀ (μM) determinados por ensaio MTT de 3,0; 2,6 e 4,0; respectivamente para as linhagens tumorais HL-60, PC-3 e SNB-19, como demonstrado na Tabela 1. Ademais, o composto CuPhGli apresentou um valor de IC₅₀ (μM) igual a 4,1 para a linhagem não tumoral de macrófagos murinos (RAW 264.7), como demonstrado na Tabela 1. A linhagem tumoral com maior seletividade quanto ao efeito citotóxico encontrado foi o câncer de próstata (PC-3), cujo valor de S.I. foi 1,5, enquanto a menor seletividade foi evidenciada para o glioblastoma (SNB-19), com índice de seletividade igual a 1,0.

Além das características inerentes ao complexo, alguns fatores relacionados às linhagens celulares podem interferir diretamente no comportamento *in vitro* da interação entre célula e substância. A linhagem PC-3, derivada de um tumor prostático metastático, demonstrou os maiores índices de toxicidade, com a maior seletividade. Dentre suas características moleculares oncogênicas, destaca-se o aumento da expressão de fatores de crescimento, como TGF-alfa e mRNA EGFR (51), que promovem a transcrição de proteínas e potencialmente expõem a molécula de DNA a ação do complexo. Entretanto, apesar desses resultados positivos, é importante relacioná-los com ensaios *in vivo*, uma vez que a proliferação *in vitro* em única camada de células não preserva a heterogeneidade original do tumor e não reproduz seu microambiente tridimensional *in vivo* (52,53). Em seguida, a linhagem HL-60, derivada de leucemia promielocítica, foi a segunda a apresentar os melhores índices de atividade antitumoral. É importante ressaltar que essa linhagem apresenta um aumento significativo da expressão do gene c-Myc, um dos principais responsáveis pelo aumento da replicação do DNA (54,55). Esse característico aumento da replicação pode ser um facilitador na interação do complexo com o material genético, o que explica a atividade citotóxica. Por fim, a linhagem

SNB-19, derivada de células de glioblastoma, apresentou os menores índices de citotoxicidade ao complexo, apresentando um comportamento não seletivo. Inicialmente, o fenótipo altamente angiogênico dessa linhagem (56) era um indicativo de correspondência com complexos a base de cobre (II), uma vez que o cobre está incluído em vias de angiogênese. Entretanto, a atividade inespecífica demonstrada pode ser explicada pelos resultados *in silico*, que demonstraram uma baixa permeabilidade do composto para células do sistema nervoso central. Sabendo-se que cada fenótipo de linhagem celular tumoral apresenta características moleculares e perfis específicos, novos estudos *in vitro* com diferentes linhagens tumorais devem ser realizados, para complementar os dados referentes ao comportamento antitumoral desse complexo.

Paralelamente às linhagens tumorais, a linhagem RAW 264.7, derivada de macrófagos/monócitos imortalizados, foi utilizada como parâmetro comparativo, a fim de reproduzir o comportamento *in vitro* do composto contra células não tumorais. Dada a importância do índice de seletividade para a avaliação da atividade citotóxica desse composto, é importante ressaltar algumas características referentes a RAW 264.7. Foi demonstrado anteriormente que, conforme as passagens celulares, essa linhagem sofre alterações em seu fenótipo celular, podendo inclusive apresentar alterações moleculares e de expressão gênica que a distanciam do perfil de célula saudável (57,58). Dessa forma, apesar da utilização recorrente dessa linhagem em avaliações de atividade antitumoral, recomenda-se novos ensaios *in vitro*, utilizando diferentes linhagens celulares não tumorais.

Há várias hipóteses inerentes ao próprio complexo para o mecanismo do seu comportamento *in vitro*. Sua citotoxicidade antitumoral corrobora com os resultados de outros compostos a base de cobre (II) evidenciados na literatura, cuja atividade antitumoral *in vitro* foi evidenciada anteriormente (11,19,25,59,60). Sabe-se que o cobre (II) está presente em diversas enzimas e vias metabólicas de forma fisiológica, e que nas células tumorais ocorre o acúmulo desse metal endógeno devido ao metabolismo acelerado secundário a proliferação (19,21,61). A atividade antitumoral do cobre (II) tem como um dos principais fatores seu efeito oxidativo, capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, que promovem lesões e alterações no material genético das células tumorais. Essas lesões em moléculas de DNA tornam-se importantes o bastante para reativar mecanismos de morte celular que foram inativados pelas alterações oncogênicas da célula tumoral. Uma vez que o principal mecanismo envolve a lesão direta do material genético, é provável que a morte celular provocada seja de forma programada, pela reativação da via intrínseca da apoptose (17,62,63). Esse mecanismo programado é especialmente importante no contexto do câncer, uma vez que mortes não programadas, como

a necrose, podem comprometer tecidos adjacentes e gerar maiores efeitos adversos locais e sistêmicos (17,64). Entretanto, o mecanismo de morte celular ainda não pode ser precisamente inferido nesse estudo, necessitando de novos experimentos diferentes, como avaliação por ensaio de anexina V em citometria de fluxo.

Todavia, o composto CuPhGli apresentou efeito citotóxico pouco específico, isto é, o mecanismo de lesão também acometeu a linhagem celular não tumoral (macrófagos murinos; RAW 264.7). Esse evento pode ser devido a diversos fatores, envolvendo principalmente a conformação geométrica do composto e as interações dos ligantes orgânicos com o centro metálico e os componentes celulares (21,26). Em um complexo organometálico, os ligantes orgânicos que formam a arquitetura do composto são capazes de alterar e interferir diretamente na atividade do centro metálico, por meio de modulações em lipofilia/hidrofília, solubilidade em fluídos extracelulares, capacidade de atravessar membranas celulares, cargas elétricas e outras propriedades físico-químicas (18,21). A própria geometria do composto é capaz de interferir em processos importantes na interação com o seu alvo molecular, facilitando a internalização do complexo, estabilizando suas ligações, etc (21). Essas mudanças são o fator essencial para caracterizar uma atividade antitumoral eficaz para complexos de cobre (II). No presente estudo, os componentes orgânicos do complexo são a fenantrolina (de estrutura aromática) e o aminoácido glicina, ambos compostos nitrogenados. Isoladamente, tanto a fenantrolina, quanto outros aminoácidos, já foram complexados com cobre (II) e demonstraram atividade citotóxica antitumoral *in vitro* (25,26,65), porém os resultados da combinação desses dois ligantes quanto aos efeitos antitumorais foram explorados de forma inédita nesse trabalho. Já foi demonstrado que o uso de ligantes orgânicos aromáticos facilita a interação do complexo com seu alvo, especialmente com o material genético, e a fenantrolina de forma específica é capaz de estabilizar ligações com o sulco menor (A-T) das fitas de DNA (66). Esse fator pode ser responsável por aprimorar os efeitos citotóxicos do complexo, porém paralelamente pode estar prejudicando a seletividade, ao facilitar a entrada e, conseqüentemente, a citotoxicidade contra a linhagem de células não tumorais RAW 264.7. Maiores estudos devem ser feitos para reavaliar as interações do composto, especialmente com alterações nos ligantes orgânicos do complexo, como por exemplo, a mudança do aminoácido utilizado.

Uma vez evidenciado de forma *in vitro* a atividade citotóxica do composto CuPhGli, maiores informações devem ser inferidas a fim de elucidar o mecanismo do seu comportamento, assim como definir outros parâmetros importantes que caracterizem o potencial uso clínico desse composto. Para responder tais questões, foram utilizadas simulações *in silico*, envolvendo

docking molecular e predição de propriedades farmacocinéticas. Dada a importância do material genético no controle do maquinário tumoral e, uma vez que se trata de um frequente alvo molecular para complexos organometálicos, foi escolhida a molécula de DNA sintético B 355D para avaliação no docking molecular. A simulação demonstrou que o composto interage com o alvo de forma espontânea, evidenciado pela Energia Livre de Ligação (ΔG_{lig}) negativa (26,67) (valor de -6,6) para ambos os sítios avaliados. A interação ocorreu preferencialmente no sulco menor do DNA (sítio 2 de ligação), de acordo com os valores menores de constante de inibição K_i para esse sítio quando comparado ao valor de K_i para o sítio 1 (respectivamente, 12,9 e 14,0), por meio de ligações hidrofóbicas. Tais resultados convergem para explicar um dos possíveis mecanismos da atividade citotóxica observada *in vitro*: lesão do material genético pela interação do centro metálico e conseqüente indução de morte celular. Essas interpretações são condizentes com outros complexos a base de cobre (II) encontrados na literatura (66). Em especial, foi observado que complexos organometálicos que possuem 1,10-fenantrolina em sua composição possuem maior tendência a interagir com o sulco menor do DNA (66). Essa interação é benéfica, uma vez que proporciona uma área de ligações mais próximas, e conseqüentemente mais estáveis, entre complexo e molécula alvo (38). Entretanto, o caráter hidrofóbico das ligações indica menor estabilidade.

Frequentemente, complexos organometálicos com atividade antitumoral possuem diversos alvos moleculares, gerando uma gama de mecanismos que convergem para morte celular (11,68). Além da lesão do material genético ocasionado pela produção de espécies reativas de oxigênio, alguns possíveis outros mecanismos para esses compostos podem incluir: interferência em enzimas importantes no processo de divisão celular, como as topoisomerases I e II (69); alterações mitocondriais que promovem a produção e liberação de proteínas pró-apoptóticas (18,70); modulação dos níveis intracelulares de cobre (61); dentre outros. Para melhor explicar a atividade citotóxica observada *in vitro*, novas simulações *in silico* com diferentes alvos moleculares devem ser realizadas, em especial as topoisomerases I e II, que são um alvo frequente para complexos organometálicos de cobre (II) (69).

Apesar do mecanismo da atividade *in vitro* ainda não ter sido completamente elucidado, é importante definir a viabilidade para uso clínico de um composto com potencial desenvolvimento farmacológico, uma vez que o complexo desse estudo apresentou efeito antitumoral. Dessa forma, a predição de propriedades farmacocinéticas por simulações *in silico* é uma etapa fundamental no rastreamento de substâncias com potencial uso clínico. Para isso, foram realizadas simulações para determinar parâmetros relacionados a absorção, distribuição,

metabolismo e toxicidade do complexo organometálicos de 1,10-fenatrolina e glicina complexado com cobre (II). Primeiramente, foi observado que o composto apresenta baixa solubilidade em água, além de ser impermeável a pele. Esses resultados indicam que há prováveis baixas taxas de absorção pela mucosa oral, que idealmente é o local de escolha para absorção medicamentosa. Em seguida, o composto apresentou uma boa absorção em região do intestino grosso ($P_{Caco}^{-2} = 96,10$), porém foi evidenciado baixa absorção em intestino delgado (valores de HIA < 30%). Essa divergência entre os locais de absorção não pode ser elucidada com os resultados iniciais. Apesar das simulações *in silico* serem fidedignas, o perfil de absorção apresentado, assim como os outros parâmetros farmacocinéticos devem ser contrapostos posteriormente com estudos *in vivo*, para maiores dados em relação ao comportamento do biocristal em sistemas reais. Ademais, foi observado que o composto não interage com as glicoproteínas P, importante proteína relacionada com a disponibilidade dos fármacos e diretamente relacionada com a resistência tumoral, uma vez que vários tumores aumentam sua expressão e impedem a absorção de fármacos (42,43). Assim, a não interação do composto com essa glicoproteína indica uma maior eficácia para linhagens tumorais resistentes.

Além da absorção, outro processo importante na avaliação de um composto é a sua distribuição pelos diversos sistemas, refletindo sua disponibilidade e perfis de efeitos colaterais por interações com órgãos diversos. Para o organometálico CuPhGli, foi observado que o composto não atravessa a barreira hemato-encefálica ($\text{LogBB} = -0,01$), o que sugere um perfil de baixos efeitos colaterais em sistema nervoso central. Ademais, foi demonstrado que células do sistema nervoso central são moderadamente permeáveis ao CuPhGli ($\text{Log PS} = -2,62$), o que parcialmente justifica a atividade antitumoral *in vitro* contra a linhagem SNB-19 apresentar um baixo índice de seletividade. Em contrapartida, foi demonstrado que o composto possui um valor adequado de fração não ligada, o que sugere uma boa disposição do fármaco livre para gerar seus efeitos terapêuticos em um sistema. A fração não ligada reflete a quantidade de composto que realmente será capaz de exercer seu mecanismo de ação, uma vez que a associação do composto com proteínas plasmáticas dificulta ou inviabiliza sua entrada no ambiente intracelular.

Em adição, é possível alterar os perfis de ambos os parâmetros de absorção e distribuição, ao modificar os ligantes orgânicos do complexo. Para o presente estudo, foi utilizado o aminoácido glicina, que demonstrou um efeito sinérgico a fenatrolina e manteve o efeito antitumoral do centro metálico. A utilização de diferentes aminoácidos na composição do composto pode ser capaz de melhorar os parâmetros de absorção e distribuição e, ao mesmo

tempo, manter o efeito citotóxico *in vitro* observado para esse complexo. Estudos *in vivo* com CuPhGli também são indicados para evidenciar maiores nuances sobre o comportamento desse composto em sistemas reais.

Outro aspecto importante a ser avaliado em substâncias com potencial desenvolvimento farmacológico é o processo de metabolismo desse composto. Essa avaliação é especialmente relevante, pois pacientes com câncer não raramente necessitam de diversas medicações, seja pelos efeitos antitumorais da associação de quimioterápicos, ou pelo uso de outras drogas sintomáticas para controle de efeitos colaterais (71). Dessa forma, é imprescindível que uma substância com efeito antitumoral não tenha um grande número de interações com complexos proteicos relacionados ao metabolismo de drogas, uma vez que esse cenário reflete diretamente as chances de interação medicamentosa com outros fármacos em uso pelo paciente. Para o presente estudo, foram avaliadas as interações do CuPhGli com as principais isoformas da enzima CYP. Dos sete CYP avaliados, o complexo CuPhGli demonstrou ser substrato para apenas um deles (CYP3A4), porém sem apresentar efeito inibitório sobre o mesmo. Para os outros CYP, o composto não demonstrou interação. Esse perfil é interessante para seu potencial uso, uma vez que demonstra uma baixa interatividade com outras vias metabólicas, indicando poucos efeitos de interação medicamentosa.

Por último, a avaliação *in silico* explorou aspectos de toxicidade para o composto. Para toda substância candidata ao desenvolvimento de um fármaco, é essencial avaliar aspectos de toxicidade em outros sistemas. Mesmo que uma substância tenha evidências de atividade antitumoral, seu uso ainda será restrito caso apresente altas taxas de toxicidade. Por isso, compostos com baixo grau de toxicidade se destacam em relação a outros com a mesma atividade citotóxica, porém com um perfil menos seguro. Para o complexo CuPhGli, foram avaliados três parâmetros: efeito carcinogênico (AMES teste), cardiotoxicidade (hERG) e hepatotoxicidade. Foi demonstrado que a substância não apresenta efeitos carcinogênicos e nem efeitos cardiotóxicos, favorecendo o seu possível uso clínico. Entretanto, foi demonstrado que o composto apresenta hepatotoxicidade. Apesar desse perfil hepatotóxico, maiores estudos relativos ao grau de toxicidade devem ser realizados antes de descartar o uso desse complexo, em especial estudos *in vivo*, que permitem uma avaliação do composto em sistemas reais.

5. CONCLUSÃO

Portanto, de acordo com os resultados observados *in vitro*, o complexo organometálico de 1,10-fenantrolina e glicina complexado com cobre (II) apresentou atividade antitumoral para as linhagens avaliadas. Esse efeito demonstrou que a associação dos ligantes orgânicos, 1,10-fenantrolina e o aminoácido glicina, funcionaram em sinergismo para proporcionar o efeito citotóxico exercido pelo centro metálico de cobre (II). O descobrimento dessa interação é importante, uma vez que abre precedentes para combinações entre 1,10-fenantrolina, um composto frequentemente presente em complexos organometálicos com conhecido efeito antitumoral, e outros aminoácidos. O uso de aminoácidos na composição do composto traz novas possibilidades de ligação com alvos moleculares, além de diferentes perfis de absorção e interação do centro metálico com estruturas celulares. Diferentes aminoácidos podem provocar diferentes conformações geométricas na estrutura química do complexo, garantindo efeitos diversos na atividade e nos mecanismos de ação do centro metálico, além de proporcionar diferentes perfis farmacocinéticos a depender dessas interações. De forma análoga, a especificidade da atividade citotóxica evidenciada *in vitro* pode ser aumentada por alterações nos ligantes orgânicos, em especial, a troca do aminoácido pode ajudar a mitigar efeitos danosos em células saudáveis. Novos estudos *in vitro* com diferentes linhagens celulares, tumorais e não tumorais, além de alterações nos ligantes orgânicos do complexo, podem trazer resultados cada vez mais robustos sobre essas interações e evidenciar combinações mais eficazes. Ademais, os ensaios *in silico* trouxeram novas informações importantes para explicar o comportamento *in vitro* demonstrado. O docking molecular demonstrou que o complexo é capaz de interagir com o material genético, o que indica um dos principais mecanismos de ação envolvidos no processo de morte celular induzida pelo CuPhGli. Entretanto, outras vias de lesão celular com outros alvos moleculares também podem estar envolvidas. Novas simulações com alvos já conhecidos na literatura para complexos de cobre (II) devem ser realizados, a fim de abranger as noções dos possíveis mecanismos para o composto CuPhGli. Paralelamente, as predições farmacocinéticas demonstraram que o complexo apresenta perfis de absorção adequados, demonstrando inclusive ser capaz de ultrapassar mecanismos de resistência tumoral, como a glicoproteína P, e também de metabolismo, com possíveis baixos índices de interação medicamentosa. Entretanto, foram observados aspectos que ainda devem ser explorados em novas pesquisas, como o comportamento discrepante de absorção apenas na porção do intestino grosso, além de demonstrar hepatotoxicidade. Tais aspectos podem também ser corrigidos por alterações nos ligantes orgânicos. Maiores detalhes e evidências quanto aos parâmetros farmacocinéticos serão melhor elucidados em futuros estudos *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra Silvia Uliana do Instituto de Ciências Biomédicas da USP por ceder gentilmente as células RAW-264.7; a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento da pesquisa.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que o estudo foi conduzido ausente de relações financeiras ou comerciais que construíssem um potencial conflito de interesse.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

V. D. F. elaborou o manuscrito, além de participar do desenho e execução dos experimentos, analisar e interpretar os resultados e discutir hipóteses. A. S. R. contribuiu com o desenho e execução dos experimentos, além de discutir hipóteses, auxiliar na interpretação dos resultados e revisar a elaboração do manuscrito. Todos os autores revisaram e aprovaram o manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World Cancer report 2020. Vol. 199, Cancer Control. 2020.
2. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008;68(21):8643–53.
3. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front Pharmacol.* 2018;9(NOV).
4. Long K, Suresh K. Pulmonary toxicity of systemic lung cancer therapy. *Respirology.* 2020;25(S2):72–9.
5. Livshits Z, Rao RB, Smith SW. An approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am.* 2014;32(1):167–203.
6. Herrmann J. Adverse cardiac effects of cancer therapies: cardiotoxicity and arrhythmia. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(8):474–502.
7. Sava G, Bergamo A, Dyson PJ. Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: What comes next? *Dalt Trans.* 2011;40(36):9069–75.
8. Herradón E, González C, Uranga JA, Abalo R, Martín MI, López-Miranda V. Characterization of cardiovascular alterations induced by different chronic cisplatin treatments. *Front Pharmacol.* 2017;8(MAY):1–15.
9. Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol.* 2018;31(1):15–25.
10. Lazarević T, Rilak A, Bugarčić ŽD. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem.* 2017;142:8–31.
11. Biersack B, Ahmad A, H. Sarkar F, Schobert R. Coinage Metal Complexes Against Breast Cancer. *Curr Med Chem.* 2012;19(23):3949–56.
12. Solomon EI, Heppner DE, Johnston EM, Ginsbach JW, Qayyum M, Kieber-emmons MT, et al. Copper Active Sites in Biology. 2015;114(7):3659–853.
13. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in Diseases and Treatments, and Copper-Based Anticancer Strategies. *Wiley Period.* 2009;30(4):708–49.
14. Li DD, Yagüe E, Wang LY, Dai LL, Yang ZB, Zhi S, et al. Novel Copper Complexes That Inhibit the Proteasome and Trigger Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *ACS Med Chem Lett.* 2019;10(9):1328–35.
15. Zhang Z, Caifeng Bi, Schmitt SM, Fan Y, Dong L, Zuo J, et al. 1,10-phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity. *J biol inorg chem.* 2012;23(1):1–7.
16. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Mol Biol Int.* 2011;2011:1–13.
17. Rezaei A, Falahati-Pour SK, Mohammadizadeh F, Hajizadeh MR, Mirzaei MR, Khoshdel A, et al. Effect of a Copper (II) complex on the induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2018;19(10):2877–

84.

18. Mahendiran D, Kumar RS, Viswanathan V, Velmurugan D, Rahiman AK. In vitro and in vivo anti-proliferative evaluation of bis(4'-(4-tolyl)-2,2':6',2''-terpyridine)copper(II) complex against Ehrlich ascites carcinoma tumors. *J Biol Inorg Chem*. 2017;22(7):1109–22.
19. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Mol Biol Int*. 2011;2011:1–13.
20. Naveen P, Jain R, Kalaivani P, Shankar R, Dallemer F, Prabhakaran R. Unpredicted formation of copper(II) complexes containing 2-thiophen-2-yl-1-thiophen-2-ylmethyl-1: H -benzoimidazole and their most promising in vitro cytotoxicity in MCF-7 and HeLa cell lines over cisplatin. *New J Chem [Internet]*. 2017;41(17):8885–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7NJ01273J>
21. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*. 2014;114(1):815–62.
22. Wadas T, Wong E, Weisman G, Anderson C. Copper Chelation Chemistry and its Role in Copper Radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des*. 2006;13(1):3–16.
23. Canakci D, Koyuncu I, Lolak N, Durgun M, Akocak S, Supuran CT. Synthesis and cytotoxic activities of novel copper and silver complexes of 1,3-diaryltriazenesubstituted sulfonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem [Internet]*. 2019;34(1):110–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1530994>
24. León IE, Ruiz MC, Franca CA, Parajón-Costa BS, Baran EJ. Metvan, bis(4,7-Dimethyl-1,10-phenanthroline)sulfatooxidovanadium(IV): DFT and Spectroscopic Study—Antitumor Action on Human Bone and Colorectal Cancer Cell Lines. *Biol Trace Elem Res*. 2019;191(1):81–7.
25. Mohammadzadeh F, Falahati-Pour SK, Rezaei A, Mohamadi M, Hajizadeh MR, Mirzaei MR, et al. The cytotoxicity effects of a novel Cu complex on MCF-7 human breast cancerous cells. *BioMetals [Internet]*. 2018;31(2):233–42. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0079-5>
26. Shamsi M, Yadav S, Arjmand F. Synthesis and characterization of new transition metal {Cu(II), Ni(II) and Co(II)} l-phenylalanine-DACH conjugate complexes: In vitro DNA binding, cleavage and molecular docking studies. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet]*. 2014;136(Ii):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.009>
27. Chu W, Wang Y, Liu S, Yang X, Wang S, Li S, et al. Synthesis, cytotoxicity and DNA-binding properties of Pd(II), Cu(II) and Zn(II) complexes with 4'-(4-(2-(piperidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-2,2':6',2''-terpyridine. *Bioorg Med Chem Lett [Internet]*. 2013;(Ii). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.07.003>
28. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology : Viability assessment , fluorescence imaging , and labeling perspectives. *Acta Histochem [Internet]*. 2018;(February):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
29. Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem*. 2015;58(9):4066–72.

30. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017;7(October 2016):1–13.
31. Krasnovskaya O, Naumov A, Guk D, Gorelkin P, Erofeev A, Beloglazkina E, et al. Copper coordination compounds as biologically active agents. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).
32. Hussain A, AlAjmi MF, Rehman MT, Amir S, Husain FM, Alsalmeh A, et al. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. *Sci Rep [Internet]*. 2019;9(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41063-x>
33. Periasamy VS, Riyasdeen A, Rajendiran V, Palaniandavar M, Krishnamurthy H, Alshatwi AA, et al. Induction of redox-mediated cell death in ER-positive and ER-negative breast cancer cells by a copper(II)-phenolate complex: An in vitro and in silico study. *Molecules*. 2020;25(19).
34. Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
35. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. 1998;19(14):1639–62.
36. Solis FJ, Wets RJ. Minimization by Random Search Techniques. *Math Oper Res*. 1981;6(1):19–30.
37. Rocha JA, Rego NCS, Carvalho BTS, Silva FI, Moraes D, Sousa JA, et al. Computational quantum chemistry , molecular docking , and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. 2018;1–23.
38. Malekshah RE, Fahimirad B, Khaleghian A. Synthesis, characterization, biomedical application, molecular dynamic simulation and molecular docking of schiff base complex of Cu(II) supported on Fe₃O₄/SiO₂/APTS. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:2583–603.
39. Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem*. 2002;37(5):399–407.
40. Mafud AC, Silva MPN, Nunes GBL, de Oliveira MAR, Batista LF, Rubio TI, et al. Antiparasitic, structural, pharmacokinetic, and toxicological properties of riparin derivatives. *Toxicol Vitr [Internet]*. 2018;50:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.02.012>
41. Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, et al. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure - Activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J Pharm Sci [Internet]*. 2001;90(6):749–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.1031>
42. Suzuki K, Taniyama K, Aoyama T, Watanabe Y. Evaluation of the Role of P-glycoprotein (P-gp)-Mediated Efflux in the Intestinal Absorption of Common Substrates with Elacridar, a P-gp Inhibitor, in Rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*

- [Internet]. 2020;45(3):385–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13318-019-00602-7>
43. Huber PC, Maruiama CH, Almeida WP. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Quim Nova*. 2010;33(10):2148–54.
 44. Lucas AJ, Sproston JL, Barton P, Riley RJ. Estimating human ADME properties, pharmacokinetic parameters and likely clinical dose in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2019;14(12):1313–27. Available from: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1660642>
 45. Ma XL, Chen C, Yang J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(4):500–12.
 46. Acosta EP. Pharmacokinetic Enhancement of Protease Inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;29:11–8.
 47. Leow JWH, Chan ECY. Atypical Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450 enzymes: A focus on substrate inhibition. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2019;169(July):113615. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.08.017>
 48. Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica* [Internet]. 2020;50(1):9–18. Available from: <https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1648911>
 49. Ames BN, Gurney EG, Miller JA, Bartsch H. Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(11):3128–32.
 50. Hanif M, Hartinger CG. Anticancer metallodrugs: Where is the next cisplatin? *Future Med Chem*. 2018;10(6):615–7.
 51. Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells*. 2019;8(1):74.
 52. Gao D, Chen Y. Organoid development in cancer genome discovery. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2015;30:42–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2015.02.007>
 53. Wilding JL, Bodmer WF. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Res*. 2014;74(9):2377–84.
 54. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* [Internet]. 1987;70(5):1233–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V70.5.1233.1233>
 55. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2015;1849(5):506–16.
 56. Welch WC, Morrison RS, Gross JL, Gollin SM, Kitson RB, Ronald H, et al. Morphologic, immunologic, biochemical, and cytogenetic characteristics of the human glioblastoma-derived cell line, SNB-19. 1995;12(Cdm):610–6.
 57. Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages.

- PLoS One. 2018;13(6):1–13.
58. Kong L, Smith W, Hao D. Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *J Cell Mol Med*. 2019;23(5):3077–87.
 59. Denoyer D, Clatworthy SAS, Cater MA. Copper Complexes in Cancer Therapy. Vol. 18, *Metal Ions in Life Sciences*. 2018. 469–506 p.
 60. Balsa LM, Ruiz MC, Santa Maria de la Parra L, Baran EJ, León IE. Anticancer and antimetastatic activity of copper(II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres. *J Inorg Biochem [Internet]*. 2020;204(July 2019):110975. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110975>
 61. Babak M V., Ahn D. Modulation of intracellular copper levels as the mechanism of action of anticancer copper complexes: Clinical relevance. *Biomedicines*. 2021;9(8).
 62. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer*. 2015;14(1):1–14.
 63. Qin QP, Liu YC, Wang HL, Qin JL, Cheng FJ, Tang SF, et al. Synthesis and antitumor mechanisms of a copper(ii) complex of anthracene-9-imidazoline hydrazone (9-AIH). *Metallomics [Internet]*. 2015;7(7):1124–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5MT00027K>
 64. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
 65. Naso LG, Martínez Medina JJ, D’Alessandro F, Rey M, Rizzi A, Piro OE, et al. Ternary copper(II) complex of 5-hydroxytryptophan and 1,10-phenanthroline with several pharmacological properties and an adequate safety profile. *J Inorg Biochem [Internet]*. 2020;204(Ii):110933. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110933>
 66. Corona-Motolinia ND, Martínez-Valencia B, Noriega L, Sánchez-Gaytán BL, Méndez-Rojas MÁ, Melendez FJ, et al. Synthesis, crystal structure, and computational methods of vanadium and copper compounds as potential drugs for cancer treatment. *Molecules*. 2020;25(20):1–23.
 67. Mahendiran D, Kumar RS, Rahiman AK. Heteroleptic silver(I) complexes with 2,2':6',2''-terpyridines and naproxen: DNA interaction, EGFR/VEGFR2 kinase, growth inhibition and cell cycle arrest studies. *Mater Sci Eng C*. 2017;76:601–15.
 68. Shi X, Fang H, Guo Y, Yuan H, Guo Z, Wang X. Anticancer copper complex with nucleus, mitochondrion and cyclooxygenase-2 as multiple targets. *J Inorg Biochem [Internet]*. 2019;190:38–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.10.003>
 69. Molinaro C, Martoriati A, Pelinski L, Cailliau K. Copper complexes as anticancer agents targeting topoisomerases i and ii. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):1–26.
 70. Glavaš-Obrovac L, Jukić M, Mišković K, Marković I, Saftić D, Ban Ž, et al. Antiproliferative and proapoptotic activity of molecular copper(II) complex of N-1-tosylcytosine. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;55(October):216–22.
 71. Ramsdale E, Lemelman T, Loh KP, Flannery M, Kehoe L, Mullaney T, et al. Geriatric Assessment-driven polypharmacy discussions between oncologists, older patients and

their caregivers. 2019;9(5):534–9.

ANEXOS

REGRAS DA REVISTA

Author Guidelines

Instructions To Authors Manuscripts (in English and single spaced), together with a cover letter from the author responsible for all correspondence, should be submitted via the online submission process, as a file saved in Microsoft Word.doc or docx. Spelling, punctuation, sentence structure, spacing, length, and consistency of usage in form and descriptions should be checked before submission. Please also check References for accuracy. Ensure that all figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in the text.

Type of Manuscripts: The Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (JPPS) publishes research articles, research reports, technical notes, scientific commentaries, news, views and review articles in the physical, chemical, biological, biotechnical, clinical, and socioeconomic-pharmacoeconomic, regulatory aspects of the pharmaceutical sciences.

Formulation development studies are only acceptable if they provide a clear advancement in the field. Applying known formulation techniques to another drug does not suffice.

A study of **natural products** will not be accepted if it only reports the pharmacological data of a certain plant or plant extracts. Identification and separation of potential active ingredients coupled with carefully planned pharmacological studies may be acceptable. In addition, attention to the time- and storage-dependent stabilities will be scrutinized.

Medicinal chemistry papers will be considered if new classes of drugs are studied with reasonable rationales, or if there is a strong rationale for developing a new derivative of an old drug. Clear identification and separation of the compounds are needed. Mere synthesis of another derivative will not suffice.

Routine **bioequivalence** studies, i.e., a comparison of the bioavailability of two or more products, will not be accepted for publication.

Analytical method development for formulations will not be acceptable unless it contains experiments with sufficient scientific rigor and breakthrough data.

For **Western blot** experiments, i) all individual traces must be provided as a supplementary file. In the main text representative traces will suffice. ii) The image should cover sufficient area around the band of interest; ideally one molecular weight marker above and one below the band. iii) The image should show the background information. iv) Bands recorded simultaneously should be shown in the same figure. v) Breaks must be placed between more than two gels recorded in different times if they are shown on the same figure.

For **population PK and/or PD** studies, provide a supplemental documents file that includes the appropriate goodness-of-fit plots.

Submission of the **author's CV** along with **unsolicited Review article** including systematic reviews, will be very useful as will expedite the process.

*** * *** **English Proof Reading and Writing** Manuscript will be accepted only when the writing style and the use English language are deemed appropriate. Authors may choose to contact editing services such as those listed below with full realization that the Journal accept no responsibility or liability regarding the service rendered and its associated business transaction.

The submission will be a **single Word.doc** including the title page, the main body of the manuscript, tables and figures at appropriate locations. When possible, insert illustrations at their appropriate spot within the paper. The file name should include your last (family) name and a keyword from the title of your manuscript.

Format: For each section, the sub-title appears as **BOLD CAPITAL**, and subsequent titles as **Bold Sentence** and then, if required, ***Bold Italic Sentence***. Text should be set in Times New Roman font, 11 point. Leave only one (1) space after periods. Start new paragraphs with an indent except for the first paragraph after a title. Do not use spaces to create indents. Use line returns only at the end of paragraphs and do not put blank lines between paragraphs. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities in your files. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page. Number pages (bottom, centre). Use proper Superscripts and Subscripts, not raised or lowered text.

Title Page: The title page should include the title of the article, author's name with full first name (no degrees), and author's affiliation. The affiliation should comprise the department,

institution (usually university or company), city, and state (or nation) and should be typed as a footnote to the author's name. For office purposes, the title page should include the name and complete mailing address including country, and email address of the one author designated to review proofs. The title page should start below the top margin, be single-spaced, and no space left before the Abstract.

Abstract: A structured abstract of fewer than 300 words is required of research articles and reports and should be arranged, in one paragraph, under the following headings: PURPOSE, METHODS, RESULTS, CONCLUSIONS. Review articles also require an abstract, which need not be organized under these headings. The purpose of a structured abstract is to assist authors in organizing their thoughts - not only to highlight their work, but also to aid readers to grasp quickly the essence of the paper.

Novelty of the Work: Provide a brief description of not more than four short sentences regarding the novelty of the paper in the cover letter.

The Main Body of the Manuscript: This section must contain Introduction, Methods, Results and Discussion. **Do not combine Results and Discussion** unless instructed by the Editor.

Under INTRODUCTION clearly state the novelty of the work.

Ethics in Animal and Clinical Investigations: Investigations using experimental animals must adhere to the "Guide to the Care and Use of Experimental Animal Care" (Canadian Council on Animal Care guidelines, 1984). All papers containing animal data must include a statement from your university's Animal Ethics Committee approving your protocol. Investigations with human subjects must follow the Declaration of Helsinki guidelines (1964) and be approved by the institutional human experimentation committee, or equivalent, and have signed in-formed consent. Ethics Approval for Animal and Human Studies: Statement that approval has been received must be included under the METHODS Section.

Statistical Approach: The number of repeat measurements and the variance of the means must be clearly depicted in the texts and in the illustrations. Reasonable significant figures (usually three) must be used as elaborated in Levy G. Significant figures or significant nonsense? Clin Pharmacol Ther, 59:363, 1996 or [Wikipedia](#).

The significant figures (SF) of a number is all certain digits plus the first uncertain digit. For example, if an assay has a sensitivity of 1 mg/L, a concentration of 32.32 mg/L has one extra uncertain and unnecessary figure. Hence, it should be reported as 32.3 which contains three SFs. See below for calculation of SFs: - 31 has 2 SF - 301 has 3 SFs - 0.022 has 2 SFs (leading zeros don't count - 4.300 has 4 SFs (trailing zeros after decimal point count) - 310 has 3 SFs (rounded off since a trailing zero with no decimal point is ambiguous).

For comparison among more than one mean, tests such as ANOVA must be use followed by an appropriate post hoc, e.g., Duncan's Multiple Range or Tukey's. The Student's t-test is not appropriate for such assessments neither as the main nor as the post hoc tool. Label means, numerical or graphical, with characters as shown below. In the legends insert 'Different characters indicate significant differences'.

In the above example, different character indicate significant difference, and the same character means no significant difference. i.e., bars labeled 'a' are not different from each other but different from 'b', 'c' and 'd' bars. A bar may have two different characters, e.g., the last bar is not significantly different from other 'b' or 'c' bars.

Figures: Figures should be numbered in one consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text, and designed to fit the column or page size of the Journal. All parts of a figure must be grouped with no segmented text box. Left justify the title below the figure (bold font). Keys to symbols should be a part of the figure, and not a part of the caption. Use the same typeface for all figures. Labels should be in title case. Figure legends should be informative and self-explanatory.

Tables: Tables should be numbered consecutively (with Arabic numerals), referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the Journal. Prepare numerical illustrations (e.g., tables) using the "table" function (rows and columns). Do not make table using text functions such as tabs, spaces or lines. Hide lines except under the column headings. Left justify the title above the table (bold font). Captions should be typed separately. Table legends should be informative and self-explanatory.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be typed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Abbreviations: Try to use abbreviations sparingly. When used extensively, provide a list of all non-standard abbreviations on a separate page before the reference section. Use the metric system for all measurements without periods (cm, ml, s). Define all symbols used in equations and formulas. When symbols are used extensively, include a list of all symbols in the notation section. Do not abbreviate the word "Figure" or "Table" in titles or text.

References: References should be numbered consecutively in the order in which they are cited in the text. Cite in the text by the appropriate Arabic numeral enclosed in parentheses, e.g., (1) or (2-5), not super or sub scripted. References to unpublished personal communications should be avoided. Use () for reference citation in the text. Place punctuation AFTER the reference. For each reference, use a single continuous paragraph with no extra space or line break. Do not use "add-ins" such as EndNotes. Abbreviations for journal names should conform to those in the Bibliographic Guide for Editors and Authors (American Chemical Society, Washington, D.C.).

***** All references must also contain DOI code when available.**

Although CSPA accepts various reference formats, the Vancouver style is preferred. Alternatively, the references should conform to the following style and punctuation:

-- Journal Article: Davies NM, Jamali F. COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: Getting to the heart of the matter. J Pharm Pharm Sci, 2004; 7:332-336.

-- Book: Mutschler, E.; Derendorf, H., Drug Actions, Basic Principles and Therapeutic Aspects. CRC, Ann Arbor, MI, USA, 1995.

-- Contribution to a Book: Jamali, F., Stereochemically Pure Drugs: An Overview, in Wainer IW: Drayer D (eds), Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology. 2nd ed., Marcel Dekker, INC, New York, NY, pp 375-384, 1993.

Acknowledgments: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to JPPS are requested to state the source of all funding that enabled the research described to be undertaken.

Conflict of interest: Declare any actual or perceived conflicts of interest on the part of any author

Author contributions: Describe each author's contributions to the manuscript.

Manuscript Submission: Manuscripts will be received by Online Submission. Manuscripts are reviewed anonymously by independent referees. To facilitate the review process, the authors should submit supplementary material such as a cited accepted (but not published) paper, which may be required for assessment of the submitted manuscript. Careful preparation of manuscripts and subsequent review of page proofs are essential, as the authors are responsible for all statements and content.

Reviewing Process: Manuscripts will be subjected to an initial editorial review. The aim of this task of editors will be to decide whether the manuscript is suitable for consideration for further process. At this stage, the suitability of the manuscript for the Journal's readership, the importance, novelty and scientific rigor of the manuscript are considered. If the manuscript is to be declined, the authors will receive a quick email indicating the editorial decision. Submissions that pass this stage will be assigned by the editor to a specific associate editor who through the Journal's database, or other means, will choose external reviewers.

The selection of the reviewers will be based on factors such as expertise, professional reputation, authors' recommendations and editors' own knowledge of a reviewer. The authors can exclude any associate editor or reviewer upon request. Reviewers are asked to declare any conflict of interest regarding the authors and/or the contents of the paper. This is a blinded process so that the reviewers' identities are anonymous unless she/he indicates otherwise. However, the reviewer will have access to the authors identity.

Upon receiving reviewers' reports, the associate editor will decide to accept, ask for revisions, reject, or ask for resubmission for another review. The reviewers' comments will be shared with the authors regardless of the decision. Attempts will be made to complete the process in four weeks. In addition, for manuscript with substantial language issues, may be recommended to use the service of any professional language editor. This may add to the length of time a manuscript is under review.

The final decision is made by the associate editor who will inform the authors of the outcome of the review. During the entire process, the authors will have access to the manuscript's review page that will clearly indicate the status of the submission. Any request for appeal or reconsideration should be directed to the editor-in-chief who will decide regarding grounds for such a requests, and/or process involved.

Upon acceptance, the manuscript will be formatted and galley will be sent to the author for proof-reading. The proof-read formatted manuscript will be posted as soon as it goes through a final inspection. Manuscripts will be assigned to an issue which, upon closure, will be reported to PubMed for listing.

Manuscripts will be subjected to active plagiarism screening during the reviewing process.

Copyright and Reference Citation: Submitted manuscripts must not be published previously or be currently under consideration for publication elsewhere. Acceptance of a manuscript for publication in the Journal will automatically place the manuscript under the terms and conditions of Creative Commons license (Attribution-ShareAlike). Authors must cite the source of any quotation or statement inserted in the manuscript.

Authors must obtain permission from publisher for any illustration and table copied or adapted from a published material. Such permissions must arrive in the Journal office via direct e-mail or fax from the publisher or original letter before the manuscript can be published.

Authors must cite the source of any quotation or statement inserted in the manuscript.

Copyright Notice

This is an open access journal with with free of charge submission and non-commercial download. At the time of submission, authors will be asked to transfer the copyright to the accepted article to the Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. The author may purchase the copyright for \$500 upon which he/she will have the exclusive copyright to the article. Nevertheless, acceptance of a manuscript for publication in the Journal is with the authors' approval of the terms and conditions of the Creative Commons copyright license [Creative Common license](#) (Attribution-ShareAlike) License for non-commercial uses.

CLOCKSS system has permission to collect, preserve, and serve this Archival Unit.

Privacy Statement

The data collected from registered and non-registered users of this journal falls within the scope of the standard functioning of peer-reviewed journals. It includes information that makes communication possible for the editorial process; it is used to inform readers about the authorship and editing of content; it enables collecting aggregated data on readership behaviors, as well as tracking geopolitical and social elements of scholarly communication.

This journal's editorial team and its hosting service, the University of Alberta Libraries, use this data to guide their work in publishing and improving this journal. Data that will assist in developing this publishing platform may be shared with its developer [Public Knowledge Project](#) in an anonymized and aggregated form, with appropriate exceptions such as article metrics. The data will not be sold by this journal, the University of Alberta Libraries, or PKP nor will it be used for purposes other than those stated here. The authors published in this journal are responsible for the human subject data that figures in the research reported here.

This website uses Google Analytics, a service which transmits website traffic data to Google servers in the United States. [Google Analytics](#) does not identify individual users or associate your IP address with any other data held by Google. This journal uses reports provided by Google Analytics to help us understand website traffic and webpage usage, and report on such usage to funding agencies, association members, and other agencies. You can opt out of Google Analytics by [installing this browser add-on](#).

Those involved in editing this journal seek to be compliant with industry standards for data privacy, including the European Union's General Data Protection Regulation (GDPR) provision for "[data subject rights](#)" that include (a) breach notification; (b) right of access; (c) the right to be forgotten; (d) data portability; and (e) privacy by design. The GDPR also allows for the recognition of "the public interest in the availability of the data," which has a particular saliency for those involved in maintaining, with the greatest integrity possible, the public record of scholarly publishing.